

TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS PARA ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS

*Luz Adriana Betancur J.**

*José Fernández Q.**

*Rogelio Ocampo C.**

*Luz Amalia Ríos V.**

Resumen

En las últimas décadas se han implementado técnicas de análisis basadas en inmunoensayos, con excelentes límites de detección para diferentes grupos de pesticidas. Estas técnicas permiten la cuantificación de analitos incluso a niveles de trazas sin la necesidad de laboriosos procedimientos de purificación y/o concentración de la muestra; la elevada especificidad de los anticuerpos para unirse a los antígenos determina que los anticuerpos se conviertan en reactivos muy útiles para la detección, purificación y cuantificación de una gran cantidad de analitos. Las moléculas pequeñas como los pesticidas, usualmente no son inmunogénicas, es decir, no provocarán una respuesta inmune, a menos que se encuentren acopladas a macromoléculas como las proteínas; es frecuente además que el analito no presente grupos funcionales que posibiliten el acoplamiento o conjugación con la proteína acarreadora; por esta razón se hace necesario sintetizar el hapteno (moléculas miméticas del analito). Los inmunoensayos son rápidos, simples y económicos, lo que los convierte en una herramienta altamente conveniente para el estudio de gran cantidad de muestras en un periodo corto de tiempo. En este artículo se presenta una revisión del estado actual del arte en este tipo de técnicas de análisis.

Palabras clave: Inmunoensayos, análisis de pesticidas, haptenos.

Abstract

IMMUNOCHEMICAL TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF PESTICIDE RESIDUES

Along the past few years, analysis of several groups of pesticides by means of techniques based on immunochemical tests have been developed with good to excellent results and very low detection limits. These techniques allow quantitative measurements even of traces of the analytes, with the advantage that complicated procedures for purification or concentration of the sample are not required. The high level of specificity of the antibodies for the antigen recognition is the key which makes antibodies to become wonderful tools for detection, purification and quantitation of a number of analytes. Small molecules, such as common pesticides, usually are not immunogenic agents so they do not generate immunoreaction by themselves, unless those small molecules be coupled to macromolecules such as proteins, and this is possible if the analyte bears functional groups useful for the conjugation to the protein. When such groups are not present, it is required to develop molecules which mimic the structure of the analyte and they are known as haptens. Immunotests are fast, simple and cheap procedures and these advantages make them highly convenient tools for the study of a number of samples in short periods of time. This paper contains a summary review of the state of art of this kind of techniques for analysis of pesticides.

Key words: Immunotests, pesticide analysis, haptens.

* Departamento de Química Universidad de Caldas. luz.betancur_ja@ucaldas.edu.co, jose.fernandez@ucaldas.edu.co, rocampo@ucaldas.edu.co, amalia.rios@ucaldas.edu.co

INTRODUCCIÓN

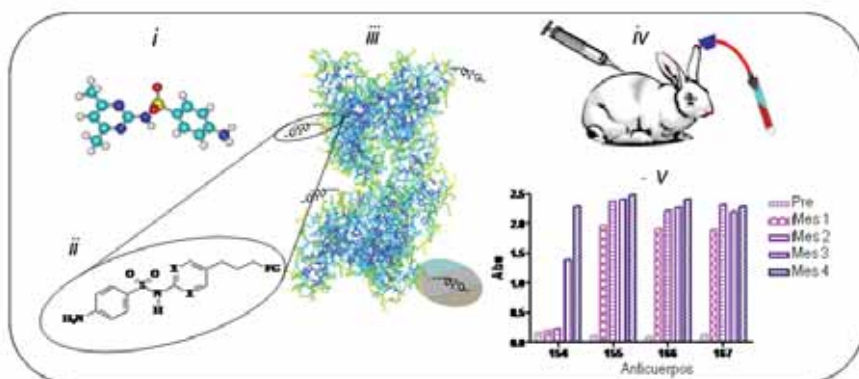
La elevada especificidad de los anticuerpos para unirse a los antígenos determina que los anticuerpos se conviertan en reactivos muy útiles para la detección, purificación y cuantificación de una gran cantidad de analitos (sustancias). La detección y en la mayoría de las ocasiones la purificación de cada antígeno requiere la producción de un anticuerpo específico. Debido a que pueden producirse anticuerpos frente a prácticamente cualquier tipo de macromolécula o sustancia química pequeña, pueden usarse técnicas basadas en el reconocimiento inmunológico antígeno-anticuerpo para prácticamente cualquier tipo de molécula en solución o a nivel celular. Las moléculas que estimulan la generación de respuestas inmunitarias se llaman inmunógenos.¹

Aunque existen moléculas que pueden producir directamente una respuesta inmunológica en un huésped adecuado (normalmente de naturaleza proteica y de peso molecular alto), existen otras, los haptenos, moléculas orgánicas de bajo peso molecular que deben previamente conjugarse con una molécula de naturaleza proteica, para así provocar en un organismo seleccionado una respuesta inmunológica.

El desarrollo de un inmunoensayo para el análisis de un pesticida, que por lo general tienen bajos pesos moleculares, comprende cinco fases bien diferenciadas que se encuentran ilustradas en el Esquema 1: i) Diseño del hapteno, ii) Síntesis del hapteno, iii) Conjugación proteica, iv) Inmunización adecuada del huésped, v) Análisis de los anticuerpos en el suero sanguíneo a lo largo del tiempo.²

Durante la selección del analito, se deben considerar factores estructurales del compuesto en cuestión, al igual que la estabilidad de los diversos productos de degradación. Dependiendo de las condiciones del medio como el pH y la temperatura, los pesticidas dan origen a diversos productos de degradación; estos productos a su vez pueden interferir o ser utilizados con los resultados del inmunoensayo. La respuesta inmunológica natural del huésped es policlonal, es decir, heterogénea, formada por una población numerosa de anticuerpos de diferente especificidad por el antígeno, y por tanto de diferente afinidad, en cuanto a que reconocen regiones del mismo (epitopes).

Esquema 1. Etapas para el análisis de un pesticida.



En las técnicas inmunológicas pueden emplearse tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Mientras que los anticuerpos policlonales, como se comentó, son poblaciones complejas formadas por distintos tipos de anticuerpos, los anticuerpos monoclonales son moléculas idénticas que poseen la misma especificidad. La técnica de producción de cantidades prácticamente ilimitadas de moléculas de anticuerpos idénticas y específicas para una determinada región de un antígeno (anticuerpos monoclonales), ha revolucionado la inmunología y ha tenido un extraordinario impacto sobre la investigación en diferentes campos que requieren anticuerpos como reactivos.³

El primer método para la producción de anticuerpos homogéneos o monoclonales fue descrito por Kohler y Milstein en 1975, y se basa en el hecho de que cada linfocito B, células del sistema inmunitario, produce un único tipo de anticuerpo con una única especificidad. Así, aislando una célula e inmortalizándola mediante fusión celular con una célula cancerígena de mieloma, se pueden obtener ilimitadamente anticuerpos idénticos. Estas líneas celulares derivadas de la fusión, se denominan hibridomas, y los anticuerpos que producen reciben el nombre de monoclonales.

Las moléculas pequeñas como los pesticidas, usualmente no son inmunogénicas, es decir, como se mencionó anteriormente, no provocarán una respuesta inmune, a menos que se encuentren acopladas a

macromoléculas como las proteínas; es frecuente además que el analito no presente grupos funcionales que posibiliten el acoplamiento o conjugación con la proteína; por esta razón se hace necesario sintetizar el hapteno (moléculas miméticas del analito). La síntesis de los haptenos, que son luego enlazados covalentemente a las proteínas acarreadoras, es un aspecto clave en la generación específica de anticuerpos, para el reconocimiento y cuantificación de moléculas pequeñas en un inmunoensayo.⁴

El grupo funcional presente en la molécula del hapteno, determina la selección del método de conjugación empleado; algunos de los procedimientos más comunes reportan la incorporación de grupos amino ($-NH_2$), carboxilo ($-COOH$), hidroxilo ($-OH$) y sulfhidrilo ($-SH$) en la estructura bien sea del hapteno o de la proteína. Las proteínas más usadas para ser conjugadas con el hapteno, son la seroalbumina bovina (BSA), ovalbumina (OVA), conalbumina (CONA), tiroglobulina (TG) y el fibrinógeno.^{5,6,7,8,9,10}

Es novedoso destacar por ejemplo, la implementación de un método de preparación y caracterización de los conjugados hapteno-proteína, para haptenos hidroxilados no cromóforos,¹¹ al igual que el desarrollo de un método de conjugación en fase sólida, utilizando proteínas enlazadas a una matriz de intercambio iónico.¹² La verificación de la reacción de acoplamiento y la determinación de la densidad del hapteno en la proteína, es decir, el número de moléculas del hapteno por número de moléculas de la proteína portadora, se puede lograr fundamentalmente mediante técnicas espectrofotométricas, para la evaluación de la disponibilidad de los grupos amino antes y después de la conjugación.

Para realizar una efectiva conjugación entre el hapteno y la proteína que presente una inmunorrespuesta, es importante caracterizar los conjugados hapteno-proteína y determinar la densidad del hapteno en la proteína. Se ha reportado por ejemplo, que relaciones altas de hapteno, por lo general, aumentan la fuerza y la especificidad de la inmunorrespuesta; sin embargo, se presenta un riesgo con el alto grado de sustitución que podría afectar la actividad y la especificidad de los anticuerpos.¹³

DIFERENTES INMUNOENSAYOS PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS

En las últimas décadas se han implementado diversos ensayos inmunológicos para el análisis de diferentes grupos de pesticidas, entre los cuales se presentan ensayos con excelentes límites de detección tanto con anticuerpos policlonales (Tabla 1), como con anticuerpos monoclonales (Tabla 2). Dependiendo del formato del inmunoensayo, que define entre otros aspectos, la selectividad, aquel puede ser usado como método cuantitativo, gracias al empleo de marcadores y a la interacción específica del anticuerpo con el analito. Los diferentes tipos de marcadores incluyen los radioisótopos y las enzimas; y la señal analítica a medir se puede determinar por fluorescencia,¹⁴ fosforescencia, quimioluminiscencia y bioluminiscencia.¹⁵ Los métodos usados con mayor frecuencia, emplean enzimas y sustratos colorimétricos en cuyo caso la señal analítica es sencillamente la absorbancia fotolorimétrica; Miles y colaboradores¹⁶ los desarrollaron por primera vez y posteriormente fueron aplicados en ensayos inmunológicos. Los marcadores enzimáticos más usados son la Peroxidasa y la Fosfatasa alcalina, debido a que presentan una serie de características indispensables para que puedan ser conjugadas efectivamente con el sustrato, como alta actividad, especificidad y estabilidad.

Las técnicas de inmunoensayo enzimático EIA (del inglés enzyme immunoassay) se constituyen en métodos analíticos que utilizan una enzima como marcador para amplificar la señal obtenida de la reacción entre un antígeno y un anticuerpo; en función de la necesidad o problema a resolver, el analito puede ser tanto el antígeno como el anticuerpo, para lo cual se emplean diferentes formatos. Las técnicas basadas en inmunoensayos, permiten la cuantificación de analitos incluso a niveles de traza sin la necesidad de laboriosos procedimientos de purificación y/o concentración de la muestra, debido fundamentalmente a dos factores: i) el extraordinario poder discriminante característico de los anticuerpos, basado en la capacidad del sistema inmunológico de producir virtualmente una variedad casi ilimitada de anticuerpos diferentes, cada uno con una afinidad específica por un agente extraño, y ii) la elevada actividad catalítica y sensibilidad enzimática en el caso de los inmunoensayos de

enzimas ligadas. Estas técnicas se distinguen por su buena sensibilidad, por el elevado número de aplicaciones y por su gran simplicidad.

Tabla 1. Límites de detección de diferentes inmunoensayos para el análisis de pesticidas a partir de anticuerpos policlonales.

HAPTENOS	SENSIBILIDAD DEL IMUNOENSAYO
Herbicidas	
alaclor ¹⁷	10 ppb
2,4-D ¹⁸	100 ppb
atrazina ¹⁹	100 ppb
cianazina ²⁰	0,5 ppb
captan ²¹	1 ppb
dicamba ²²	10 ppb
glifosato ²³	1 ppm
metalaclor, alaclor, acetoclor ²⁴	0,06-0,4 ppb
paraquat ²⁵	0,1 ppb
picloram ²⁶	10 ppb
bensulfuron metílico ²⁷	0,002 ppb
ciclohexanediona ²⁸	0,1 ppb
fluoroxipir, triclopir ²⁹	10 ppb
metosulam ³⁰	0,1 ppb
trifluralina ³¹	1 ppb
Insecticidas	
adicarb ³²	0,03 ppb
azadiractin ³³	0,5 ppb
carbofuran ³⁴	0,3 ppb
etofenproxi ³⁵	1 ppb
fenitrotion ³⁶	0,3 ppb
fenoxicarb ³⁷	0,5 ppb

Organofosforados	
esfenvalerato ³⁸	3 ppb
cloronicotinil-imidaclopride ³⁹	35 ppb
fosalone ⁴⁰	20 ppb
Fungicidas	
tiabendazol ⁴¹	9 ppb
tiram ⁴²	30 ppb

Tabla 2. Límites de detección de diferentes inmunoensayos para el análisis de pesticidas a partir de anticuerpos monoclonales.

HAPTENO	SENSIBILIDAD DEL INMUNOENSAYO
Herbicidas	
2,4-D ⁴³	0,1 ppb
atrazina ⁴⁴	0,1 ppb
paraquat ⁴⁵	1 ng
terbutrina ⁴⁶	0,13 ppb
Insecticidas	
carbaril ⁴⁷	0,74 ppb
carbofuran ⁴⁸	10 ppb
flucitrinato ⁴⁹	1 ppb

Las técnicas de inmunoensayo enzimático se pueden dividir en dos grupos: inmunoensayo enzimático EMIT (del inglés enzyme-mediated immunoassay technique), y el análisis de la enzima ligada o ELISA (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay).

Inmunoensayo enzimático homogéneos: en un EMIT, la reacción inmunológica tiene lugar en un medio líquido; por tanto, son ensayos homogéneos; la clave de este tipo de metodología radica en que la actividad del conjugado enzimático está modulada por la formación del

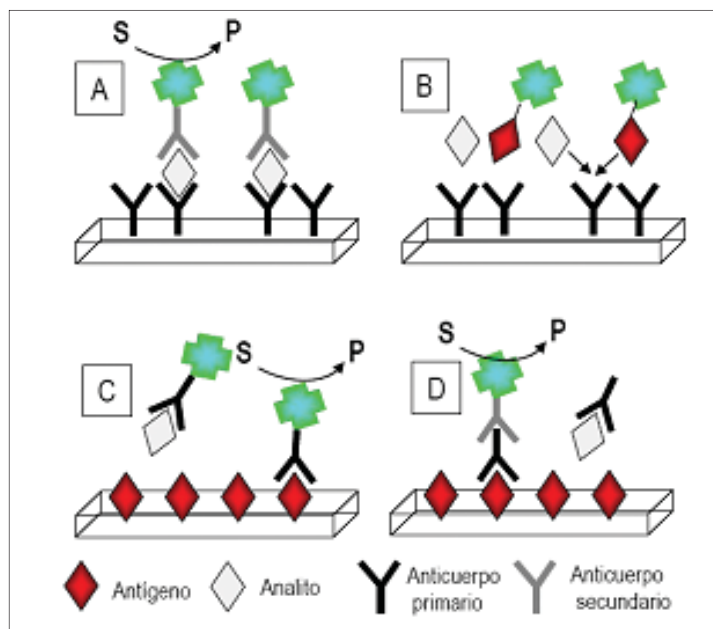
complejo antígeno-anticuerpo; como ninguno de los inmunorreactivos está inmovilizado en fase sólida, en este caso no hace falta separar el inmunocomplejo –como en el caso de los inmunoensayos heterogéneos– mediante etapas de lavado.

Inmunoensayo enzimático heterogéneos: en el análisis del tipo ELISA, una de las especies inmunológicas (el antígeno o el anticuerpo), se encuentra inmovilizado en la superficie de una fase sólida (por lo general pocillos de poliestireno de una placa de microtitulación). El complejo antígeno-anticuerpo formado en la fase sólida se separa de los reactivos libres en solución (y que se encuentran en exceso) antes de proceder a la medición del marcador enzimático mediante la reacción enzimática con el sustrato adicionado para obtener la señal colorimétrica.⁵⁰ Se pueden diferenciar dos tipos de ELISA: competitivo y no competitivo.⁵¹

Inmunoensayo no competitivo o tipo sándwich: se utilizan dos tipos de anticuerpos, cada uno puede reconocer un antígeno diferente. En el formato más común, un anticuerpo está inmovilizado en la fase sólida (anticuerpo de captura) y el otro está conjugado con una enzima como se ilustra en el Esquema 2 (A). Después de la etapa de incubación, el antígeno analito queda entonces atrapado entre los dos anticuerpos –que deben estar en exceso–. El primero, para permitir una adsorción completa del antígeno, y el segundo, para asegurar la marcación completa del inmunocomplejo. En este caso, la concentración del analito es directamente proporcional a la cantidad de la enzima medida en la reacción. Este formato se utiliza cuando se emplean antígenos polivalentes y de alto peso molecular.

Inmunoensayo competitivo: en este formato, el analito (que puede ser un antígeno o un anticuerpo) compite con el antígeno o el anticuerpo respectivamente marcado con la enzima, por los limitados sitios de enlace del inmunorreactivo de captura inmovilizado en el soporte sólido (anticuerpo o antígeno respectivamente). Este formato se utiliza, por lo general, cuando se emplean antígenos de bajo peso molecular o haptenos que poseen un único sitio de unión –monovalentes–. El inmunocomplejo queda marcado con una enzima e inmovilizado en fase sólida. La eliminación de los inmunorreactivos libres y presentes en exceso mediante un simple lavado y adición del sustrato adecuado para el marcador enzimático, permiten medir la actividad enzimática y evaluar el grado de competición.

Esquema 2. Diferentes clases de inmunoensayos.



Los cuatro formatos de ELISA competitivo son:

- **ELISA competitivo con antígeno marcado.** Esquema 2 (B). El analito y el antígeno marcado compiten por el anticuerpo fijado en la superficie de la fase sólida.
- **ELISA por desplazamiento.** Tiene el mismo formato que el anterior, pero en este caso, previamente se coloca un exceso del antígeno marcado que ocupa todos los sitios disponibles. Después se deja reaccionar con la muestra que contiene el analito y éste desplaza parte del antígeno marcado. Dicho desplazamiento depende de la concentración del analito, ya que la unión analito-anticuerpo es una reacción de equilibrio dinámico.
- **ELISA competitivo directo.** Esquema 2 (C). En este caso la enzima marca directamente el anticuerpo primario.

- **ELISA competitivo indirecto.** Esquema 3 (D). Tanto el analito como el antígeno (inmovilizados en la fase sólida), compiten por el sitio de enlace con el anticuerpo. El complejo reacciona con un segundo anticuerpo marcado.

KITS COMERCIALES PARA ANÁLISIS DE PESTICIDAS

La gran mayoría de los inmunoensayos comerciales para pesticidas (o kits de análisis) presentan un formato competitivo como el que se ilustra en el Esquema 2 (B, C, D). Una de las grandes ventajas de su empleo, es la rapidez, la sensibilidad y la posibilidad de efectuarse *in situ* con una gran cantidad de muestras por día. Con todo lo anterior y a pesar de estas ventajas, la acertada aplicación de estos métodos en monitoreos rápidos, depende de varios factores que incluyen entre otros, la calidad del analito, que considera parámetros como la repetitibilidad y reproducibilidad, y de su validación en comparación con aquellos resultados obtenidos mediante técnicas convencionales. En la Tabla 3 se presentan algunos de los kits de inmunoensayo para el análisis de pesticidas.⁵²

Tabla 3. Algunos kits de inmunoensayos comerciales para el análisis de pesticidas.

COMPUESTO DETECTADO	FABRICANTE	COMPUESTO DETECTADO	FABRICANTE
acetanilidas	EnviroLogix (P)	fluometuron	Millipore (P,T)
acetoclor	Millipore (P)	glifosato	EnviroLogix (P)
triazinas	Baker (T) Millipore (P)	paraquat	EnviroLogix (P)
carbaryl	Baker (T)	paration	EnviroLogix (P) Millipore (P) Baker (T)
ciclodienos	EnviroLogix (P)	paration metílico	EnviroLogix (P)
clordano	EnviroLogix (P)	piretroides sintéticos	Millipore (P)
2,4-D	Baker (T) EnviroLogix (P)	Screening para insecticidas	EnviroLogix (P)
DDT	Millipore (P,T)	Insecticidas piretroides	EnviroLogix (p)

P= Kit en placa; T= Kit en tubo.

INMUNOENSAYOS POR GRUPOS DE PESTICIDAS: ALGUNAS APLICACIONES

Insecticidas

Organoclorados: La aplicación de esta clase de compuestos ha sido prohibida en Estados Unidos y otros países, puesto que diversos estudios han demostrado su persistencia en el ambiente al igual que la de sus productos de degradación. Entre los insecticidas organoclorados más usados se destaca el 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano, más conocido como DDT. Diversos problemas endocrinos y neurológicos se han relacionado con la contaminación generada por este compuesto y por su principal metabolito el 1,1-dicloro-2,2-bis (4-clorofenil) etileno o DDE. Muy pocos inmunoensayos se han reportado en la literatura para los insecticidas organoclorados, debido a dificultades en las etapas de síntesis de los haptenos. Se ha reportado el desarrollo de un EIA no competitivo, basado en la separación de los complejos analito-anticuerpo y de los anticuerpos libres, utilizando una columna de inmunoafinidad cromatográfica.⁵³ No obstante de la simplicidad del método, presentó muy buena sensibilidad (límite de detección de 8 ng.L⁻¹). Otro inmunoensayo fue reportado por el grupo de Botchkareva para el DDT con detección por quimioluminiscencia,⁵⁴ aplicado mayoritariamente en muestras de alimentos.⁵⁵

Por su importancia a nivel local, cabe destacar el insecticida endosulfán. Este compuesto pertenece también a los organoclorados, dentro del subgrupo de los ciclodienos. Introducido en la década de 1950, emergió como uno de los productos químicos más importantes usados contra una amplia variedad de insectos y ácaros en la agricultura y sectores relacionados. Técnicamente el endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido), es una sustancia cristalina formada por dos estereoisómeros, el alfa y el beta endosulfán en relación 7:3;⁵⁶ es usado para el control de insectos bien sea por contacto o por ingestión.⁵⁷

El primer inmunoensayo reportado para ciclodienos, fue el publicado por Langone y Van Vunakis.⁵⁸ Dreher y Podrasky generaron anticuerpos para el endosulfán diol conjugado a una proteína. El endosulfán diol fue

conjugado, esterificando un grupo hidróxilo con anhídrido succínico para producir el brazo espaciador de hemisuccinato, y luego acoplándolo a la proteína. Este ensayo no resultó lo suficientemente adecuado para el análisis de muestras de agua, puesto que se detectaba el metabolito no tóxico, endosulfán diol, con una sensibilidad similar a la del endosulfán. El límite de detección de este ensayo fue reportado en 3 ppb de endosulfán.

El inmunoensayo reportado por Bushway,⁵⁹ fue desarrollado inicialmente para el clordano, pesticida también del grupo de los ciclodienos, que mostró tal grado de reacción cruzada con el endosulfán que se utilizó para cuantificar este último, con un límite de detección de 1,0 ppb, pero tanto este ensayo, como el anterior, no discriminan el endosulfán diol. Un inmunoensayo competitivo para la detección del endosulfán fue descrito por Reck y Frevert⁶⁰ empleando diferentes brazos espaciadores sobre el endosulfán diol, dando como resultado una inhibición más sensible, sin embargo el tiempo de reacción es largo e involucra dos etapas de incubación.

Stanker⁶¹ desarrolló un inmunoensayo empleando anticuerpos monoclonales partiendo de derivados del clordeno; este ensayo también mostró falta de sensibilidad y presentó alrededor de 6 veces más alta sensibilidad para el β -endosulfán que para el α -endosulfán. En este ensayo también se presentaron reacciones cruzadas con otros metabolitos del endosulfán y fue aplicado para el análisis de residuos de ciclodienos en grasas.

Fue reportado otro inmunoensayo para ciclodienos utilizando anticuerpos monoclonales producidos a partir de los análogos del aldrin éter, presentando una sensibilidad bastante baja para el endosulfán; este ensayo también reconoció más fácilmente el isómero β que el α -endosulfán.

El grupo de Skerritt,⁶² desarrolló un inmunoensayo para la detección de residuos del endosulfán presentes en agua y suelos. Para generar los anticuerpos que son sensibles y selectivos para los metabolitos del endosulfán, fue necesario llevar a cabo la síntesis de tres haptenos. Uno de los haptenos fue preparado por derivatización del endosulfán diol, mientras que los otros haptenos se derivaron de anillos rígidos de 5 miembros adyacentes al anillo hexaclorociclopentadieno (ciclodieno); empleando

diversas combinaciones de hapteno. Los ensayos óptimos tienen un límite de detección de 0,2 ppb del endosulfán y en este ensayo se detectó en el rango 0,2-10 ppb. Las muestras de agua pueden ser analizadas directamente sin extracción con solventes, mientras que en las muestras de suelos pueden ser extraídas de forma simple con metanol al 90%.

N-Metilcarbamatos y organofosforados: estos insecticidas se han empleado como alternativa al uso de los organoclorados, debido a que la persistencia en el ambiente y su potencial de bioacumulación son relativamente bajos.⁶³ Los principios activos de esta clase de compuestos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, que participa en los procesos de transmisión del impulso nervioso. Debido a su aplicación actual, su monitoreo se vuelve de gran importancia para garantizar la vida de los ecosistemas. Diversos EIA se han desarrollado para detectar y cuantificar los inhibidores de la acetilcolinesterasa, casi todos ellos basados en anticuerpos monoclonales.^{64, 65, 66} Recientemente se han desarrollado anticuerpos policlonales que posibilitarán la implementación de ELISAs altamente selectivos y sensibles para el análisis de esta clase de compuestos.^{67, 68}

Herbicidas

Los herbicidas hacen parte del grupo de pesticidas que más se ha empleado a nivel mundial; es por ello que se ha detectado en el ambiente gran cantidad de residuos de estos compuestos. Los herbicidas del grupo de las triazinas han sido los más estudiados, seguidos por el grupo de las acetanilidas. Avances en las técnicas de producción de los anticuerpos han permitido la obtención y purificación de anticuerpos monoclonales altamente selectivos para la detección de las s-triazinas. Bruun y colaboradores⁶⁹ sintetizaron y caracterizaron diversos haptenos a partir de los herbicidas atrazina, hidroxiatrazina, simazina, hidroxisimazina, cianazina y tertbutilazina, obteniendo los correspondientes anticuerpos; además del estudio de reactividades cruzadas.

Entre los herbicidas pertenecientes al grupo de las acetanilidas, los más estudiados son el alaclor y el acetoclor, los cuales ya poseen protocolos validados; y algunos kits de EIAs para estos compuestos son considerados

métodos oficiales para *screening* de muestras de agua.⁷⁰ Estos métodos están basados en ELISA competitivo, desarrollado en un formato que emplea placas de poliestireno y presenta elevadas sensibilidades (con valores IC₅₀ entre 0,75 a 2500 ppb y límites de detección entre 0,05 y 1,3 ppb).

Fungicidas

De todas las clases de pesticidas, los fungicidas han sido los menos estudiados, con relación al desarrollo de los inmunoensayos. En general, la síntesis de los haptenos de esta clase de compuestos es compleja, sin embargo ya se encuentra en el mercado un kit de análisis rápido utilizado para el monitoreo de residuos del fungicida procimidona en muestras vegetales.⁷¹

CONCLUSIONES

Los avances más recientes en el área de los métodos inmunoquímicos incluye la elaboración de nuevos formatos de ensayos que involucren la detección mediante técnicas altamente sofisticadas,⁷² la ejecución de proyectos de ensayos multiresiduales o el surgimiento de diversos métodos desarrollados por cromatografía de inmunoafinidad.⁷³ Así, en la actualidad la atención se ha centrado en la implementación de kits de inmunoensayos para la detección y cuantificación de residuos de pesticidas, principalmente los de última generación.

En la mayoría de casos, en menos de una hora se puede obtener respuesta a los análisis, posibilitando el estudio de gran cantidad de muestras al mismo tiempo. Para llevar a cabo dicho proceso, es necesario iniciar con el diseño y la síntesis de haptenos de diversa estructura, como punto clave para la producción de los anticuerpos monoclonales y policlonales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Dirección de Postgrados en Química de la Universidad de Caldas.

REFERENCIAS (Endnotes)

- ¹ Singh K.V., Kaur J., Grish C., Varshney R. (2004). *Bioconjugate Chem.*, 15, 1.
- ² Goodrow, M. H., Harrison, R. O., and Hammock, B. D. (1990). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 990.
- ³ Szurdoki F., Szekacs A., Le H.M., Hammock B.D. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 29.
- ⁴ Abad A., Manclu's J., Mojarrad F., Mercader J., Miranda M., Primo J., Guardiola V., Montoya A. (1997). *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3694-3702.
- ⁵ Naar J., Branaa, P., Chinain M., Pauillac S. (1999). *Bioconjugate Chem.*, 10, 1143.
- ⁶ Tout N.L., Yau K.Y.F., Trevors J.T., Lee H., Hall J.C. (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3628.
- ⁷ Rader C., Ritter G., Nathan S., Elia M., Gout. I. (2000). *J. Biol. Chem.*, 275, 13668.
- ⁸ Saini S.S., Hein W.R., Kaushik A. (1997). *Mol. Immunol.*, 34, 641.
- ⁹ Muylldermans S. (2001). *Mol. Biotechnol.*, 74, 277.
- ¹⁰ Tanha J., Xu P., Chen Z., Ni F., Kaplan H., Narang S.A. (2001). *J. Biol. Chem.*, 276, 24774.
- ¹¹ Houen G., Olsen D., Hansen P.R., Petersen K.B., Barkholt V. (2003). *Bioconjugate Chem.*, 14, 75.
- ¹² Sashidhar R.B., Capoor A. K., Ramana D. (1994). *J. Immunol. Methods.*, 167, 121.
- ¹³ Marco M., Gee S., Hammock B.D. (1995). *Trends Anal Chem.*, 14, 415.
- ¹⁴ Erlanger B.F. (1980). *Methods Enzymol.*, 70, 85.
- ¹⁵ Dewen T., Yang H., Jinyi W., Americ. (2007). *J. of Agricul. And Biolog. Sciences*, 2, 2, 88.
- ¹⁶ Miles L.E., Hayes C.N. (1968). *Nature*, 219, 188.
- ¹⁷ Feng P.C., Wratter S.J., Horton S.R., Sharp C.R., Logusch E.W. (1990). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 159.
- ¹⁸ Hall J.C., Deschamps R.J.A, Krieg K.K. (1989). *J. Agric. Food Chem.*, 37, 981.
- ¹⁹ Krämer K., Lepschy J., Hock B. (2001). *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 84, 150.
- ²⁰ Lawruk T.S., Kachman C.E., Jordan S.W., Fleeker J.R., Herzog D.P., Rubio F.M. (1993). *J. Agric. Food Chem.*, 41, 747.
- ²¹ Yeung J.M., Newsome W.H. (1993). *J. Assoc. Off Anal. Chem. Int.*, 76, 1225.
- ²² Clegg B.B., Stephenson G.R., Hall J.C. (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2168.
- ²³ Clegg B.B., Stephenson G.R., Hall J.C. (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5031.
- ²⁴ Casino P., Morais S., Puchades R., Maquieira A. (2001). *Env. Sci. Technol.*, 35, 4111.
- ²⁵ Spinks C.A, Wang B., Mills E.N.C., Morgan M.R.A. (1999). *Analyst*, 124, 847.

- ²⁶ Deschamps R.J.A., Hall J.C. (1990). *Immunochemicals methods for environmental analysis, ACS Symposium Series.*, 442, 66.
- ²⁷ Lee J.K., Ahn K.C., Park O.S., Ko Y.K., Kim D.W. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 17.
- ²⁸ Webb S.R., Hall J.C. (2001). *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 84, 143.
- ²⁹ Johnson B.D., Hall J.C. (1996). *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 488.
- ³⁰ Parnel J.S., Hall J.C. (1998). *J. Agric. Food. Chem.*, 46, 152.
- ³¹ Riggle B. (1991). *Environ Contam. Toxicol.*, 46, 404.
- ³² Braddy J.F., Fleeker J.R., Wilson R.A., Mumma R.O. (1989). *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 382, 262.
- ³³ Hemalatha K., Venugopal N.B., Rao B.S., (2001). *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 84, 1001.
- ³⁴ Jourdan S.W., Scutellaro A.M., Fleeker J.R., Herzog D.P., Rubio F.M. (1995). *J. Agric. Food. Chem.*, 43, 2784.
- ³⁵ Miyake S., Hayashi A., Kumeta T., Kitajima K., Kita H. (1998). Ohkawa H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1001.
- ³⁶ Watanabe E., Kanzaki Y., Tokumoto H., Hoshino R., Kubo H., Nakazawa H. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 53.
- ³⁷ Szurdoki S., Szécsák A., Le H.M., Hammock B.D. (2002). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 29.
- ³⁸ Lee J.K., Ahn K.C., Park O.S., Kang S.Y., Hammock B.D. (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2159.
- ³⁹ Li K., Li Q.X. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3378.
- ⁴⁰ Issert V., Lazaro R., Lamaty F., Rolland V., Besancon P., Caporiccio B. (1999). *Amino Acids*, 17, 377.
- ⁴¹ Bushway R.J., Young B.E., Paradis L.R., Perkins L.B. (1994). *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, 77, 1243.
- ⁴² Gueguen F., Boide F., Queffelec A.L., Haelters J.P., Thouvenot D., Corbel B. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4492.
- ⁴³ Gerdes M., Meusel M., Spener F. (1997). *Anal. Biochem.*, 252, 198.
- ⁴⁴ Choi M.J., Jo C., Choi J., Kang C.Y., Han C.T. (1999). *J. Immunoass.*, 20, 57.
- ⁴⁵ Holthues H., Pfeifer-Fukumura U., Hartmann I., Baumann W. (2001). *J. Anal. Chem.*, 371, 897.
- ⁴⁶ Nagao M., Takatori T., Wu B., Tarazawa K., Gotoudam H., Akabane H. (1989). *J. Immunoass.*, 10, 1.
- ⁴⁷ Moreno M.J., Abad A., Montoya A. (2001). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 72.
- ⁴⁸ Alcocer M.J., Doyen C., Lee H.A., Morgan M.R. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 335.

- ⁴⁹ Watanabe E., Watanabe S., Ito S., Hayashi M., Watanabe T., Yuasa Y. (2000). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5124.
- ⁵⁰ Price C.P., Newman D.J. (1991). In: *Principles and Practice of Immunoassays*, C.P. Price, D.J. Newman (Eds.), Stockton Press, New York.
- ⁵¹ Hennion MC, Barceló D. (1998). *Anal. Chim. Acta*, 36, 3.
- ⁵² Gabaldón J.A., Maquieira A., Puchades R. (1999). *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 39, 519.
- ⁵³ Eremenko A.V., Bauer C.G., Makover A., Kanne B., Baumgarten H., Scheller F.W. (1998). *Anal. Chim. Acta*, 358, 5.
- ⁵⁴ Botchkareva A.E., Fini F., Eremin S.A., Mercader J.V., Montoya A., Girotti S. (2002). *Anal. Chim. Acta*, 453, 43.
- ⁵⁵ Botchkareva A.E., Eremin S.A., Montoya A., Manclús J.J., Mickova B., Rauch P., Fini F., Girotti S. (2003). *J. Immunol. Met.*, 283, 45.
- ⁵⁶ Kumar M., Philip L. (2006). *J. Of Hazardous Materials B.*, 136, 354.
- ⁵⁷ <http://www.bayercropscience.com>
- ⁵⁸ Langone, J.J.; Van Vunakiss, H. (1975). *Res. Común. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 10, 265-675.
- ⁵⁹ Bushway, R. J., Perkins, B., Ferguson, B.S. (1988). *Environmental Protection Agency*, 433-437.
- ⁶⁰ Reck, B., Frevert, J. (1990). *ACS Symposium Series 442*; American Chemical Society: Washington, DC, 193-198.
- ⁶¹ Stanker, L.H., Watkins, B. (1991). *ACS Symposium Series 451*; American Chemical Society: Washington, DC, 108.
- ⁶² Lee N., Skerritt J., McAdam D. (1995). *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1730.
- ⁶³ Mickova B., Zrostlikova J., Hajslova J., Rauch P., Moreno M.J., Abad A., Montoya A. (2003). *Anal. Chim. Acta*, 495, 123.
- ⁶⁴ Nunes G.S., Barceló D. (1999). *Trends Anal. Chem.*, 18, 99.
- ⁶⁵ Nunes G.S., Marco M., Farré M., Barceló D. (1999). *Anal. Chim. Acta* 387, 245.
- ⁶⁶ Nunes G.S., Marco M., Ribeiro M.L., Barceló D. (1998). *J. Chromat.*, 823, 109.
- ⁶⁷ Kim Y.J., Cho Y.A., Lee H., Lee Y.T. (2003). *Anal. Chim. Acta* 494, 29.
- ⁶⁸ Kim Y.J., Cho Y.A., Lee H., Lee Y.T., Gee S.J., Hammock B.D. (2003). *Anal. Chim. Acta*, 475, 85.
- ⁶⁹ Bruun L., Koch C., Jakobsen M.H., Pedersen B., Christiansen M. (2001). *Anal. Chim. Acta*, 436, 87.
- ⁷⁰ Striley C.A.F., Biagini R.E., Mastin J.P., MacKenzie B.A., Robertson S.K. (1999). *Anal. Chim. Acta*, 399, 109.

⁷¹ Fernández A., Valverde A., Agüera A., Contreras M., Rodríguez D. (1995). *Anal. Chim. Acta*, 311, 371.

⁷² Eremin A.S., Ryabova I.A., Yakovleva J.N., Yazynina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. (2002). *Anal. Chim. Acta*, 468, 229.

⁷³ Nunes G.S., Toscano I.A., Barceló D. (1998). *Trends Anal. Chem.*, 17, 79.